

Statement of Accuracy of Translation

I, Melissa Stanford, a translator with Chillson Translating Service, 3530 Chas Drive, Hampstead, Maryland, 21074, hereby declare as follows:

That I am familiar with the German and English languages;

That I am capable of translating from German to English;

That the translation attached hereto is a true and accurate translation of German Application titled, "Substance for Obtaining Highly Effective Tumor Medications as well as a Process."

By Melissa Stanford

Date Jan 18, 2000

Translator's Note:

The term "Spi g lmere" could not b found in available sources and was translat d simply as "spiegelm rs" (German page 6, line 24; English page 7, line 7 from the bottom).



VERIFICATION OF TRANSLATION

#13
CENTER 1600/2900

2 8 2001

I, Melissa Stanford, a translator with Chillson Translating Service, 3530 Chas Drive, Hampstead, Maryland, 21074, hereby declare as follows:

That I am familiar with the German and English languages;

That I am capable of translating from German to English;

That the translation attached hereto is a true and accurate translation of German Application P 198 59 248.5 titled, "Substance for Obtaining Highly Effective Tumor Medications as well as a Process" filed with the German Patent and Trademark Office on December 22, 1998;

That all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true;

And further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any registration resulting therefrom.

By Melissa Stanford

Executed this 8 day of Aug 2001.

Witness Anne Chilton

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

Certificate

Professor Dr. Heinz Peter Vollmers and Professor Dr. Hans Konrad Müller-Hermelink, both in Würzburg/Germany, filed a patent application under the designation

"Substance for Obtaining Highly Effective Tumor Medications as well as a Process"

with the German Patent and Trademark Office on December 22, 1998.

The attached copy is a true and accurate rendition of the original documents of this patent application.

In the German Patent and Trademark Office, the application has provisionally received the symbols C 07 K, A 61 K and C 12 N of the International Patent Classification.

[Seal]

Munich, January 31, 2000

The German Patent and Trademark Office

The Director

/s/

Wehner

File No.: P 198 59 248.5

ABSTRACT

=====

Substance for Obtaining Highly Effective Tumor Medications as well as a Process

The invention relates to a substance for obtaining highly effective tumor medications, whose production includes the following steps: purification of hybridoma-produced SC-1 antibodies with FPLC processes, removal and purification of cells of cell line 23132, obtaining membrane preparations by the membranes being separated from other components by centrifuging and being placed in membrane lysis buffer, as well as purification of the p82 proteins via gel filtration/anion column.

Substance for Obtaining Highly Effective Tumor Medications
as well as a Process

The invention relates to a substance as well as a process for obtaining highly effective tumor medications.

Gastric carcinoma is one of the most common types of cancer worldwide. According to Lauren in "The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal Type Carcinoma," Acta Path Microbiol Scand; 64: 331-49, they are histologically divided into diffuse adenocarcinomas and intestinal adenocarcinomas. Intestinal gastric carcinomas are often accompanied by chronic gastritis B and especially by intestinal metaplasias, which are considered to be precursors of dysplastic alterations and of gastric carcinomas. Differences between these two types are also indicated in that patients with carcinomas of diffuse type often belong to blood group A, from which it can be deduced that genetic factors influence the risk of cancer, while environmental factors, e.g., a Helicobacter pylori infection, are possibly of importance for the development of carcinomas of the intestinal type. It is noted that gastric-adenocarcinomas are becoming less common in the West but are on the rise in the East.

Up until now, therapy has been limited to gastrectomy and lymphadenectomy, but because of the still poor prognosis, there is a need for a new accompanying therapy. Immunological studies have shown that even in cases in which the immune system cannot effectively control malignant cells, a cellular and humoral

activity can be measured, which is not sufficient, however, to destroy the tumor cells. An effective effort is now to isolate the antibodies that originate from the immune response of the patient, to reproduce them in a suitable manner and to use them therapeutically. Thus, for example, antibodies that originate from the biological activity of patients with lung, esophageal and colon cancer were isolated, and human monoclonal antibodies that influence, e.g., direct differentiation and the growth of the tumor cells, but which in most cases have the problem of interaction with other tumors or healthy cells, were derived therefrom.

It is known that human monoclonal SC-1 antibodies can trigger apoptosis in gastric carcinoma cells (Vollmers et al., "Apoptosis of Stomach Carcinoma Cells Induced by a Human Monoclonal Antibody," *Cancer*; 76: 550-58). Apoptosis is the programmed cell death, suicide of cells, by fragmentation of the DNA, plasmolysis and dilatation of the endoplasmatic reticulum, followed by cell fragmentation and the formation of membrane vesicles, the so-called apoptotic elements. Apoptosis, the physiological form of cell death, ensures a quick and smooth removal of unnecessary cells without triggering inflammatory processes or tissue damages as in the case of necrosis. Under pathological conditions, it is also used to remove malignant cells, such as, for example, cancer precursor cells. It can be triggered by the most varied stimuli, such as, for example, by cytotoxic T-lymphocytes or cytokines, such as tumor necrosis factors, glucocorticoids and antibodies. It is the most common

cause of death of eucaryotic cells and occurs in embryogeneses, metamorphoses and tissue atrophy. Apoptotic receptors on the cell surface, such as that of the NGF/TNF family, are predominantly expressed in lymphocytes, but are also found in various other tissues, and thus they are not suitable for cancer treatment. In in-vivo tests, ligands and antibodies for these receptors have led in particular to liver damage. Tumor-specific receptors with an apoptotic function are therefore especially important.

As the starting point for obtaining antibodies, biopsy material is removed from an animal or human with an immune response against gastric carcinoma cells. Human monoclonal antibodies are now obtained by PEG fusion or electroimmortalization, whereby the latter is carried out by fusion with myeloma or heteromyeloma cells so that antibody-producing hybridomas form. These hybridomas are tested both for specificity and also functionality, whereby specificity in this case designates the selective attachment of the antibodies to the tumor cell and functionality designates the action of the antibodies to combat the tumor. Thus, for example, lymphocytes obtained from the spleen and lymph nodes were fused in a ratio 1:1 with heteromyeloma cells, and especially effective antibodies, so-called SC-1 antibodies, were obtained by suitable testing, whereby SC-1 designates a clone that produces human monoclonal antibodies (Vollmers et al., "SC-1, A Functional Human Monoclonal Antibody Against Autologous Stomach Carcinoma Cells," Cancer Res; 49:2471-76). In this case, it is an immunoglobulin-

M-(Lambda)-antibody that triggers apoptosis in 65% of diffuse and 25% of intestinal gastric adenocarcinomas. For tests, gastric carcinoma cell lines were set up for use as target cells, whereby in particular the cell line 23132 (described in Vollmers et al., "Characterization of Four New Gastric Cancer Cell Lines," Virchows Archiv B Cell Pathol; 63: 335-43) turned out to be especially suitable. This cell line has been filed and is freely accessible at the following filing location:

DSM

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
[German Collection of Microorganisms and Cell Cultures] GesmbH,
Braunschweig [Brunswick].

The effectiveness of the antibodies obtained depends basically on the quality of testing for specificity and functionality. An ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay) or, e.g., a Western blot can be used for checking the specificity. The test for functionality or apoptosis can be done, e.g., with MTT tests (mitochondrial-hydroxylase-enzymatic activity test), morphology tests or DNA degradation tests.

The object of the invention is to make available a substance that makes possible much more selective testing.

This object is achieved according to the invention by a substance that is obtained by a production process that includes the following steps: purification of hybridoma-produced SC-1 antibodies with FPLC processes, removal and purification of cells

of cell line 23132, obtaining membrane preparations by the membranes being separated from other components by centrifuging and being placed in membrane lysis buffer, as well as purification of the p82 proteins via gel filtration/anion column.

The substance is a receptor, the gastric tumor cell for the apoptosis-triggering human monoclonal SC-1 antibodies. It is an isoform of CD-55 which is specific to gastric carcinomas and which has a specific receptor property based on sugar radicals that are connected to the protein via a N-link. Its relative molecular weight is 82kDa. Using this substance testing for specificity can now be done much more effectively, and thus the yield can be considerably increased in the production of antibodies that can be used in turn for highly effective tumor medications. Instead of conducting tests based on autologous tumor cells or cell lines, rather the receptor substance itself is used for this purpose.

SDS gel electrophoresis and Western blot with SC-1 antibodies are recommended for quality and quantity measurement in production.

The membrane preparations are thus subjected to gel electrophoresis, preferably SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). In this way, the proteins of the membrane preparation are separated according to weight and charge. In the Western blot, first an electric current is applied to the gel containing the separated proteins, by which the proteins reach the membrane. In doing so, separation continues. The sites of the membrane that have not been reached

by a protein are blocked, i.e., treated such that no antibodies at all can adhere there. At this point the purified SC-1 antibodies are brought into contact with the membrane. By adding a so-called second antibody and a substrate, the positive sites, thus those where an antibody has reacted with a protein, are made visible by the change of color and thus detected. As a result, sites with positive proteins, i.e., proteins to which antibodies have been attached, and sites that have an altered color and that are distributed on the membrane are thus obtained. Conclusions regarding the weight of the corresponding protein can be drawn from the location of one such site.

The SC-1 antibodies are suitably purified with ion exchange- and/or gel filtration FPLC systems. For separation by centrifuging, the removed cells can be brought into a hypotonic buffer solution, incubated for 50 minutes on ice, and ensonified for 5 minutes, the nuclei are pelletized by 10 minutes of centrifuging at 10,000 g, and the cell membranes are pelletized by 30 minutes of centrifuging at 100,000 g. The membrane proteins can be purified by means of sequential size exclusion chromatography or anion exchange chromatography.

Advantageously the test for specificity and/or functionality of a process according to the preamble of claim 6 is carried out in the presence of the substance according to the invention. In the past, testing had to resort to autologous material or cell lines, whereby especially in cell lines the problem existed that over the long term, a change in the tumor cells had to be feared and that therefore testing may not have been done effectively

enough. The substance that is made available according to the invention now allows specific and ultimately more selective testing and thus to a large extent facilitates the search for active ingredients.

In a suitable way, the biopsy material is material from the spleen and/or lymph nodes, this therefore because the proportion of B-lymphocytes is especially high there. Even with material removed in a small amount, a large amount of antibodies that may be therapeutically usable is obtained.

The biopsy material can be removed from a gastric carcinoma patient. By selecting the corresponding antibodies and reproducing them, a high dose thereof can thus be injected into the patient so that the threshold for destroying tumor cells is reached. Primarily the fact that the antibodies originate from the patient himself and that therefore triggering of an immune response need not be expected is further advantageous.

The biopsy material can also be removed from an animal into which gastric carcinoma cells or the substance according to the invention has been injected. By, e.g., intraperitoneal injection, the organism is brought into contact with gastric tumor cells, which can reproduce there. The immune system reacts to them by forming antibodies, and by removing the biopsy material, the latter can then be tested accordingly. Often, antibodies originating from mice are used, but they can trigger an immune response in turn in a patient so that often the approach is to humanize these antibodies, whereby then the FC portion is replaced by a human FC portion.

CLAIMS

=====

1. Substance for obtaining highly effective tumor medications, whose production is characterized by the following steps:

Purification of hybridoma-produced SC-1 antibodies with FPLC processes, removal and purification of cells of cell line 23132, obtaining membrane preparations by the membranes being separated from other components by centrifuging and being placed in membrane lysis buffer, as well as purification of the p82 proteins via gel filtration/anion column.

2. Substance according to claim 1, characterized by SDS gel electrophoresis and Western blot with SC-1 antibodies for quality and quantity measurement in production.

3. Substance according to claim 1 or 2, characterized by purification of the SC-1 antibodies with ion exchange and/or gel filtration FPLC.

4. Substance according to claim 1, 2 or 3, wherein for separation by means of centrifuging, the removed cells are placed in a hypotonic buffer solution, incubated for 15 minutes on ice and ensonified for 5 minutes, the nuclei are pelletized by 10 minutes of centrifuging at 10,000 g, and the cell membranes are pelletized by 30 minutes of centrifuging at 100,000 g.

5. Substance according to one of the preceding claims, characterized by purification of the membrane proteins by sequential size exclusion chromatography or anion exchange chromatography.

6. Process for obtaining highly effective tumor medications based on monoclonal antibodies, in addition to murine and human, e.g., also humanized, bispecific, single-strand, chimeric and fragmented antibody forms derived therefrom, with p82 specificity, in which a biopsy material is removed from an animal or human with an immune response to gastric carcinoma cells, cells of this biopsy material are fused with myeloma cells or heteromyeloma cells, by which hybridomas that produce antibodies are obtained, whereby the antibodies that are produced by the hybridomas are tested both for specificity of attachment to tumor cells and for functionality for combatting thereof to isolate particular hybridomas and to subsequently reproduce particular hybridomas, which produce tumor-combatting antibodies, so that monoclonal antibodies are obtained which represent a highly effective active ingredient for treatment of a carcinoma, wherein the test for specificity and/or functionality is carried out in the presence of the substance according to one of the preceding claims.

7. Process according to claim 6, wherein the biopsy material originates from the spleen and/or lymph nodes.

8. Process according to claim 6 or 7, wherein the biopsy material is removed from a gastric carcinoma patient.

9. Process according to claim 6, 7 or 8, wherein the biopsy material is removed from an animal into which gastric carcinoma cells or the substance according to claim 1 has been injected.



Bescheinigung

RECEIVED
DEC 28 2001
TECH CENTER 1600/2900

Die Herren Professor Dr. Heinz Peter Vollmers und Professor Dr. Hans Konrad Müller-Hermelink, beide in Würzburg/Deutschland, haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Substanz zur Gewinnung hochwirksamer Tumorarzneien
sowie Verfahren"

am 22. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 31. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wehner

Aktenzeichen: 198 59 248.5

Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

5

Substanz zur Gewinnung hochwirksamer
Tumorarzneien sowie Verfahren

10

Die Erfindung bezieht sich auf eine Substanz zur Gewinnung hochwirksamer Tumorarzneien, deren Herstellung, folgende Schritte beinhaltend: Reinigung
15 der von Hybridomen produzierten SC-1-Antikörper mit FPLC-Verfahren, Entnahme und Reinigung von Zellen der Zelllinie 23132, Gewinnung von Membranpräparaten, indem die Membrane durch Zentrifugieren von den anderen Bestandteilen getrennt und in Membran-
20 Lysis-Puffer gebracht werden, sowie Reinigung der p82 Proteine über Gelfiltration/Anionensäule.

Substanz zur Gewinnung hochwirksamer
Tumorarzneien sowie Verfahren

5 Die Erfindung bezieht sich auf eine Substanz sowie
ein Verfahren zur Gewinnung hochwirksamer Tumorarz-
neien.

10 Beim Magenkarzinom handelt es sich um eine der
weltweit häufigsten Krebsarten. Nach Lauren "The
two histological main types of gastric carcinoma:
diffuse and so-called intestinal type carcinoma",
Acta Path Microbiol Scand; 64:331-49, werden sie
histologisch eingeteilt in diffuse Adenokarzinome
und intestinale Adenokarzinome. Intestinale Magen-
15 karzinome sind oft von chronischer Gastritis B be-
gleitet und insbesondere von intestinalen Metapla-
sien, die als Vorläufer dysplastischer Veränderun-
gen und von Magenkarzinomen betrachtet werden. Un-
terschiede zwischen diesen beiden Arten zeigen sich
20 auch darin, daß Patienten mit Karzinomen des diffu-
sen Typs oft der Blutgruppe A angehören, woraus auf
den Einfluß genetischer Faktoren beim Krebsrisiko
geschlossen werden kann, während Umweltfaktoren, z.
B. eine Helicobacter-pylori-Infektion, möglicher-
25 weise für die Entstehung von Karzinomen des inte-
stinalen Typs von Bedeutung sind. Zwar ist ein ab-
nehmende Häufigkeit der Magenadenokarzinome im We-
sten festzustellen, dafür treten sie aber nun ver-
mehrt im Osten auf.

30

Die Therapie war bislang auf Gastrektomie und
Lymphadenektomie beschränkt, aufgrund der auch dann
noch schlechten Prognose besteht jedoch der Bedarf

nach einer neuen begleitenden Therapie. Immunologische Studien haben gezeigt, daß auch in Fällen, in denen das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann, eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar ist, die aber nicht ausreicht um die Tumorzellen zu zerstören. Ein wirkungsvoller Ansatz ist nun der, von der Immunantwort des Patienten stammende Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und therapeutisch einzusetzen. So wurden beispielsweise von der biologischen Aktivität von Patienten mit Lungen-, Ösophagus- und Dickdarmkrebs stammende Antikörper isoliert und davon humane monoklonale Antikörper abgeleitet, die z. B. direkt Differentiation und das Wachstum der Tumorzellen beeinflussen, welche aber zumeist das Problem der Wechselwirkung mit anderen Tumoren oder gesunden Zellen haben.

Es ist bekannt, daß humane monoklonale SC-1-Antikörper Apoptose bei Magenkarzinomzellen auslösen können (Vollmers et al, "Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody", Cancer; 76:550 - 58). Apoptose ist der programmierte Zelltod, Selbstmord von Zellen, durch Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern. Apoptose, die physiologische Form des Zelltods, garantiert eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebsverletzungen auszulösen wie im Falle der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient es auch dem Entfernen ma-

ligner Zellen, wie etwa Krebsvorgängerzellen. Sie kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glukokortikoide und Antikörper. Sie ist die häufigste Todesursache eukaryotischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie sind prädominant auf Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenem anderen Gewebe, weshalb sie sich nicht für eine Krebstherapie eignen, insbesondere haben bei In-Vivo-Tests Liganden und Antikörper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt. Deshalb sind Tumorspezifische Rezeptoren mit apoptotischer Funktion besonders wichtig.

Als Ausgangspunkt der Antikörpergewinnung wird einem Tier bzw. Menschen mit Immunantwort gegen Magenkarzinomzellen Biopsiematerial entnommen. Humane monoklonale Antikörper werden nun durch PEG-Fusion oder Elektroimmortalisation gewonnen, wobei letzteres durch Fusion mit Myelom oder Heteromyelomzellen erfolgt, so daß sich Antikörper produzierende Hybridome bilden. Diese Hybridome werden sowohl auf Spezifität als auch auf Funktionalität getestet, wobei Spezifität dabei die selektive Anlagerung der Antikörper an die Tumorzelle und Funktionalität die Wirkung der Antikörper zur Bekämpfung des Tumors bezeichnet. So wurden etwa aus der Milz und Lymphknoten gewonnene Lymphozyten im Verhältnis 1:1 mit Heteromyelom-Zellen verschmolzen und durch geeignete Testung besonders wirkungsvolle Anti-körper

per, sogenannte SC-1-Antikörper gewonnen, wobei SC-1 einen Klon, der humane monoklonale Antikörper produziert, bezeichnet (Vollmers et al, "SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells", Cancer Res; 5 49:2471 - 76). Es handelt sich dabei um einen Immunglobulin-M-(Lambda)-Antikörper der bei 65 % der diffusen und 25 % der intestinalen Magen-adenokarzinome Apoptose auslöst. Für die Testungen wurden Magenkarzinomzelllinien zur Verwendung als Targetzellen eingerichtet, wobei sich insbesondere die Zelllinie 23132 (beschrieben in Vollmers et al, "Characterization of four new gastric cancer cell lines", Virchows Archiv B Cell Pathol; 63:335 - 43) 10 als besonders geeignet herausstellte. Diese Zelllinie ist hinterlegt und frei zugänglich bei der folgenden Hinterlegungsstelle:

DSM
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen GesmbH,
20 Braunschweig

Die Wirksamkeit der gewonnenen Antikörper hängt grundlegend von der Güte der Testung auf Spezifität und Funktionalität ab. Für die Überprüfung der Spezifität können ein ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) oder z. B. Western-Blots Verwendung finden. Der Test auf Funktionalität bzw. Apoptose kann z. B. mit MTT-Tests (Mitochondrial-Hydroxylase-Enzymatic-Activity-Test), Morphologietests oder DNA-Degradationstests erfolgen. 25 30

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht

darin, eine Substanz zur Verfügung zu stellen, die eine viel selektivere Testung ermöglicht.

5 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Substanz gelöst, gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, das folgende Schritte beinhaltet: Reinigung der von Hybridomen produzierten SC-1-Antikörper mit FPLC-Verfahren, Entnahme und Reinigung von Zellen der Zelllinie 23132, Gewinnung von Membran-

10 präparaten, indem die Membrane durch Zentrifugieren von den anderen Bestandteilen getrennt und in Membran-Lysis-Puffer gebracht werden, sowie Reinigung der p82 Proteine über Gelfiltration/Anionensäule.

15 Bei der Substanz handelt es sich um den Rezeptor, der Magentumorzelle für apoptoseauslösende humane monoklonale SC-1-Antikörper. Sie ist eine Isoform von CD-55, welche für Magenkarzinome spezifisch ist und deren spezifische Rezeptoreigenschaft auf Zuckerresten beruht, die über einen N-Link mit dem

20 Protein verbunden sind. Ihr relatives Molekulargewicht beträgt 82kDa. Mit Hilfe dieser Substanz kann nun die Testung auf Spezifität viel wirkungsvoller erfolgen und damit die Ausbeute bei der Herstellung von Antikörpern, die wiederum bei hoch-

25 wirksamen Tumorarzneien Verwendung finden können, erheblich gesteigert werden. Anstatt die Testungen anhand von autologen Tumorzellen oder Zelllinien durchzuführen, wird also vielmehr die Rezeptorsubstanz selbst dafür eingesetzt.

30

Zur Qualitäts- und Quantitätsmessung bei der Herstellung sind SDS-Gelelektrophorese und Western-

Blot mit SC-1-Antikörpern empfehlenswert.

Die Membranpräparate werden also einer Gelelektrophorese unterzogen, vorzugsweise einer SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis). Dadurch werden die Proteine des Membranpräparats entsprechend Gewicht und Ladung getrennt. Beim Western-Blot wird nun zunächst ein elektrischer Strom an das die getrennten Proteine enthaltende Gel angelegt, wodurch die Proteine auf eine Membran gelangen. Dabei bleibt die Trennung bestehen. Die Stellen der Membran, auf die kein Protein gelangt ist, werden blockiert, d. h. so behandelt, daß dort keinesfalls Antikörper anhaften können. Es werden nun die gereinigten SC-1-Antikörper mit der Membran in Kontakt gebracht. Mittels Zugabe eines sogenannten second antibody und eines Substrats, werden die positiven Stellen, also jene wo ein Antikörper mit einem Protein reagiert hat, durch Farbveränderung sichtbar gemacht und so detektiert. Als Ergebnis erhält man also auf der Membran verteilte farbveränderte Stellen mit positiven Proteinen, d. h. Proteinen, an die sich Antikörper angelagert haben. Aus dem Ort einer solchen Stelle wird auf das Gewicht des zugehörigen Proteins geschlossen.

Zweckmäßiger Weise erfolgt die Reinigung der SC-1-Antikörper mit Ionentausch- und/oder Gelfiltrations-FPLC-Systemen. Zur Trennung mittels Zentrifugieren können die entnommenen Zellen in eine hypotonische Pufferlösung gebracht, 50 Minuten auf Eis inkubiert und 5 Minuten sonifiziert werden, die

Zellkerne durch 10-minütiges zentrifugieren bei 10.000 g und die Zellmembrane durch 30-minütiges zentrifugieren bei 100.000 g pelletiert werden. Die Reinigung der Membranproteine kann mittels Sequential-Size-Exclusion- oder Anion-Exchange-Chromatographie vorgenommen werden.

In vorteilhafter Anwendung erfolgt der Test auf Spezifizität und/oder Funktionalität eines Verfahrens gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 6 unter Anwesenheit der erfindungsgemäßen Substanz. Bisher mußte die Testung auf autologes Material oder auf Zelllinien zurückgreifen, wobei insbesondere bei Zelllinien das Problem bestand, daß langfristig eine Veränderung der Tumorzellen zu befürchten war und daß daher die Testung möglicherweise nicht effektiv genug ausgeführt werden konnte. Die zur Verfügung gestellte erfindungsgemäße Substanz gestattet nun eine spezifische und letztlich noch selektivere Testung und erleichtert damit in großem Maße die Suche nach Wirkstoffen.

Geeigneter Weise handelt es sich beim Biopsie-Material um solches aus Milz und/oder Lymphknoten, dies deshalb weil dort der Anteil an B-Lymphozyten besonders hoch ist. Selbst bei geringer Menge entnommenen Materials gelangt man so zu einer großen Menge möglicherweise therapeutisch einsetzbarer Antikörper.

Das Biopsie-Material kann einem Magenkarzinom-Patienten entnommen sein. Durch Auswahl entsprechender Antikörper und deren Vermehrung kann nun also dem

5 Patienten eine hohe Dosis derselben injiziert werden, so daß die Schwelle zur Zerstörung der Tumorzellen erreicht wird. Vorteilhaft ist daran vor allem die Tatsache, daß die Antikörper vom Patienten selbst stammen und daß daher nicht mit der Auslösung einer Immunantwort gerechnet werden muß.

10 Das Biopsiematerial kann auch einem Tier entnommen sein, dem Magenkarzinomzellen oder die erfindungsgemäße Substanz injiziert worden ist. Durch z. B. intraperitoneale Injektion wird der Organismus in Kontakt mit Magentumorzellen gebracht, die sich dort vermehren können. Das Immunsystem reagiert darauf durch Antikörperbildung und durch Entnahme
15 des Biopsiematerials können diese dann entsprechend ausgetestet werden. Häufig werden von Mäusen stammende Antikörper eingesetzt, die aber beim Patienten wiederum eine Immunantwort auslösen können, so daß auch oft dazu übergegangen wird, diese Antikörper zu humanisieren, wobei dann der FC-Teil durch
20 einen humanen FC-Teil ersetzt ist.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

=====

5 1. Substanz zur Gewinnung hochwirksamer Tumorarz-
neien, deren Herstellung durch folgende Schritte
gekennzeichnet ist:

10 Reinigung der von Hybridomen produzierten SC-1-An-
tikörper mit FPLC-Verfahren, Entnahme und Reinigung
von Zellen der Zelllinie 23132, Gewinnung von Mem-
branpräparaten, indem die Membrane durch Zentrifu-
gieren von den anderen Bestandteilen getrennt und
in Membran-Lysis-Puffer gebracht werden, sowie Rei-
15 nigung der p82 Proteine über Gelfiltra-
tion/Anionensäule.

20 2. Substanz nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch**
SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot mit SC-1-An-
tikörpern zur Qualitäts- und Quantitätsmessung bei
der Herstellung.

25 3. Substanz nach Anspruch 1 oder 2, **gekennzeichnet**
durch Reinigung der SC-1-Antikörper mit Ionen-
tausch- und/oder Gelfiltrations-FPLC.

30 4. Substanz nach Anspruch 1, 2 oder 3, **dadurch ge-
kennz ichn t**, daß zur Trennung mittels Zentri-fu-
gieren die entnommenen Zellen in eine hypo-tonische
Pufferlösung gebracht, 15 Minuten auf Eis inkubiert
und 5 Minuten sonifiziert werden, die Zellkerne

durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 10.000 g und die Zellmembrane durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 100.000 g pelletiert werden.

5

5. Substanz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** Reinigung der Membranproteine mittels Sequential-Size-Exclusion- und/oder Anion-Exchange-Chromatographie.

10

6. Verfahren zur Gewinnung hochwirksamer Tumorarzneien auf Basis monoklonaler Antikörper, neben murinen und humanen, z.B. auch davon abgeleitete humanisierte, bispezifische, einzel-strängige, chimäre, und fragmentierte Antikörper-formen mit p82 Spezifität, bei dem einem Tier bzw. Menschen mit Immunantwort gegen Magenkarzinomzellen Biopsiematerial entnommen wird, Zellen dieses Biopsiematerials mit Myelom- oder Heteromyelom-zellen fusioniert werden, wodurch Antikörper produzierende Hybridome erhalten werden, wobei die von den Hybridomen produzierten Antikörper sowohl auf Spezifizität der Anlagerung an Tumorzellen als auch auf Funktionalität zu deren Bekämpfung getestet werden, um jene Hybridome zu isolieren und in weiterer Folge zu vermehren, die tumorbekämpfende Antikörper erzeugen, so daß monoklonale Antikörper erhalten werden, die einen hochwirksamen Wirkstoff zur Behandlung eines Karzinoms darstellen, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Test auf Spezifizität und/oder Funktionalität unter Anwesenheit der Substanz nach einem der vorhergehenden Ansprüche erfolgt.

15

20

25

30

22.12.98

- 3 -

5 7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Biopsiematerial aus Milz und/oder Lymphknoten stammt.

10 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Biopsiematerial einem Magenkarzinompatienten entnommen ist.

15 9. Verfahren nach Anspruch 6, 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Biopsiematerial einem Tier entnommen ist, dem Magenkarzinomzellen oder die Substanz nach Anspruch 1 injiziert worden ist.